Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln
Berlin - Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus Holldack

DIE EINWIRKUNG VON STILBAMIDIN AUF DIE GRANULOPOESE IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ralf Bernd Sterzel
Regenwalde

1966

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln,
Berlin - Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

Die Einwirkung von Stilbamidin auf die Granulopoese in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ralf Bernd Sterzel
Regenwalde

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. Witt

Referent: Priv.Doz.Dr.med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. Dezember 1966

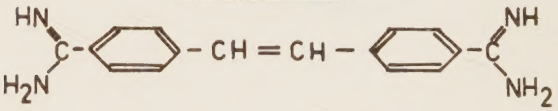
Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Historisches und Chemie	1
II.	Fragestellung	5
III.	Methodik	7
IV.	Ergebnisse	14
	1.) Morphologie	14
	2.) Differentialzählung der Knochenmarkzellen	15
	3.) Differentialzählung der Mitosen	30
V.	Diskussion	34
VI.	Zusammenfassung	43
VII.	Literaturverzeichnis	

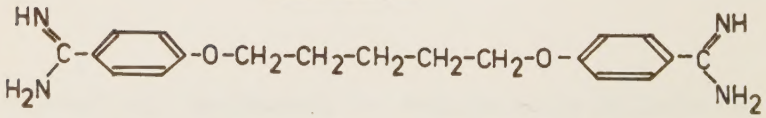
I. Historisches und Chemie

Auf der Suche nach trypanoziden Substanzen stellten v. JANSCO u.a. (30) 1935 fest, dass Guanidine sowohl in vitro als auch in vivo starke protozoazide Wirkung zeigten. Wegen ihrer Toxizität konnten diese Stoffe therapeutisch nicht verwendet werden. Eine Prüfung chemisch verwandter Substanzen führte zur Entdeckung der Diamidinverbindungen, die, am Menschen angewandt, deutlich trypanozid wirksam waren, ohne dass sich bei ihrer Anwendung wesentliche toxische Begleiterscheinungen einstellten. 1939 erzielten LOURIE und YORKE (32) eine weitere Verbesserung der therapeutischen Ergebnisse mit ähnlichen Verbindungen, die aromatische Gruppen als Träger für die beiden stark basischen Amidingruppen aufwiesen. Drei Verbindungen - Stilbamidin, Pentamidin und Propamidin - sind seither zu verbreiteter therapeutischer Anwendung gekommen; sie

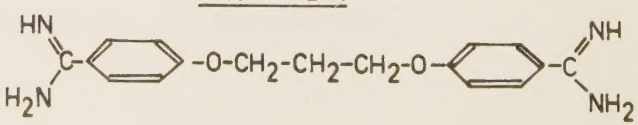
STILBAMIDIN



PENTAMIDIN



PROPAMIDIN



unterscheiden sich chemisch nur in der Struktur der Trägergruppen voneinander und besitzen weitgehend gleiche chemotherapeutische Eigenschaften.

Besonders mit Stilbamidin wurden seit 1939 in der Prophylaxe und Behandlung von einigen Trypanosomen- und Leishmanieninfektionen sehr gute Erfolge erzielt (LOURIE (32), SNAPPER (45), KARNOFSKY (33)). In der Wundbehandlung kamen die aromatischen Diamidine wegen ihrer verhältnismässig geringen antiseptischen Wirkung vor der Entdeckung der Antibiotika zur Anwendung KOHN u.a. (34)). Dagegen hat die Diamidinanwendung bei Blastomykosen in den letzten Jahren zu günstigen Ergebnissen geführt (KARNOFSKY). Ausgeprägte antiparasitäre Eigenschaften von Stilbamidin und Pentamidin wurden auch von IVADY u.a. (28, 29) und von BODIAN u.a. (5) bei der erfolgreichen Beeinflussung der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie bei Frühgeborenen beschrieben.

Die ausgezeichnete Wirkung der aromatischen Diamidine auf die viszerale Leishmaniose (Kala Azar) zeigte sich besonders in der prompten Verminderung der für diese Krankheit typischen Hyperglobulinämie. Diese Tatsache veranlasste SNAPPER (41, 42) 1946, Diamidine zur Chemotherapie bei multiplen Plasmocytomen (Kahlersche Erkrankung) heranzuziehen, da diese malignen Tumorbildungen der eiweissproduzierenden Plasmazellen des Knochenmarks meist ebenfalls mit einer Erhöhung der Serumglobuline verbunden sind.

Die kausal gerichtete Stilbamidinanwendung bewirkte bei Plasmocytomkranken jedoch nur in seltenen Fällen eine Senkung des pathologisch erhöhten Globulinspiegels; auch konnte weder von SNAPPER noch von anderen Autoren (HORSTER u. SANDKUEHLER 1950, SCHOEN u. TISCHENDORF 1950, SCHULTEN u. PRIBILLA 1955, GROSS u.

BOCK 1957, DAMESHEK u. GUNZ 1962) eine echte, pathologisch-anatomisch objektivierbare Remission der Krankheit mit beträchtlicher Verringerung der Plasmocytomzellen im Knochenmark beobachtet werden. Jedoch haben die gleichen Autoren nicht selten nach Verwendung von aromatischen Diamidinen bei Plasmocytomkranken eine deutliche Linderung der starken Knochenschmerzen feststellen können. SNAPPER (42, 43) sowie HORSTER u. SANDKUEHLER (26) haben in einigen Fällen nach Behandlung der Kahlerschen Erkrankung mit Stilbamidin Rekalzifizierungen in osteolytischen Knochenbezirken beobachtet, wodurch auf einen - wenigstens temporären - Stillstand der osteoklastischen Proliferation der Plasmocytomzellen und damit auf eine Krankheitsverzögerung durch Stilbamidineinwirkung geschlossen wurde. HEILMEYER u.a. (23) haben darüber hinausgehend bei zwei Plasmocytomfällen eine sichere Reduktion der pathologischen Plasmazellen im Knochenmark und eine Normalisierung des stark erhöhten Globulinspiegels im Serum nach der Anwendung von Stilbamidin beschrieben.

Wegen dieser teilweise positiven Ergebnisse, besonders aber wegen des Mangels an sicher wirksamen anderen Therapieverfahren, hat sich die Behandlung der Kahlerschen Krankheit mit Stilbamidin in manchen Fällen bis heute halten können (GOLDECK (17), GROSS u. BOCK (19), HAUSCHILD (21), HEILMEYER (24)). Auch bei der Behandlung von Reticulosen konnte von GUNZ (20) und HORSTER u. ESSER (27) bei den Kranken eine subjektive Besserung unter der Diamidintherapie beobachtet werden.

Obwohl sich mit Stilbamidin nur sehr selten eine deutliche Beeinflussung, nie eine völlige Rückbildung der plasmazellulären Neoplasien erzielen liess, konnte SNAPPER (42, 43, 44) 1947 eine besondere Beziehung zwischen Stilbamidin und den Plasmocytomzellen nachweisen. Durch cytochemische Untersuchungen

stellte er eine starke Stilbamidinanreicherung in den Plasmocytomzellen fest, die wesentlich höher lag als die in den normalen Zellen des menschlichen Organismus. Eine ähnlich starke, selektive Aufnahme von Stilbamidin fand HAWKING (22) schon 1944 bei einigen Blutparasiten, z.B. bei den Trypanosomen, die durch Stilbamidin in kurzer Zeit abgetötet wurden. SNAPPER führte seine Beobachtung auf die besondere Affinität des Stilbamidin zu den die Eiweiss-Synthese katalysierenden Ribonucleinsäuren (RNS) im Cytoplasma der pathologischen Plasmazellen zurück, als deren morphologisches Substrat in den betroffenen Zellen mikroskopisch erkennbare, basophile Präzipitate auftraten. Es konnte fluorometrisch nachgewiesen werden, dass diese "Granula" aus einer Verbindung von Stilbamidin und Nucleinsäuren bestanden. SNAPPER schlug deshalb vor, das Stilbamidinmolekül wenigstens als Träger für eine Substanz mit spezifischer cytostatischer Wirkung auf Plasmazellen zu benutzen, da Stilbamidin selbst diese Wirkung nicht im ausreichenden Mass besass. Allerdings hat KOPAC (35) 1945 und 1947 nach zahlreichen histochemischen Experimenten einen cytostatischen Effekt von aromatischen Diamidinen in vitro beschrieben. Er beobachtete, dass Stilbamidin auf die neoplastischen Zellen verschiedener Gewebekulturen von Tiertumoren destruierenden Einfluss hatte, der sich in der Aufhebung der Mitosen und in der elektiven Zerstörung der Geschwulstzellen zeigte. An den normalen Zellen war keine Schädigung festzustellen.

Wie SNAPPER beschrieben auch KOPAC (35) und BICHOWSKI (4) einen Einfluss des Stilbamidins auf die Nucleoproteide, insbesondere auf die Ribosenucleinsäuren, im Cytoplasma der beeinträchtigten Geschwulstzellen bzw. Bakterien. Diese Beziehung zeigte sich bei SNAPPER unter anderem darin, dass nach Zusatz von RNS zur Kultur die basophilen Granula der Plasmocytomzellen verschwanden. BICHOWSKI stellte eine Aufhebung der bakteriostatischen und fun-

giziden Wirkung nach Zugabe von RNS oder Polyaminen zur Kultur fest.

Ueber den genauen Wirkungsmechanismus der aromatischen Diamidine auf Protozoen, Pilze und neoplastische Tumorzellen geben auch die neueren Untersuchungen verschiedener Autoren noch keine erschöpfende Auskunft. Es wird neben der Veränderung von Nucleoproteiden auch eine Enzymstörung in den Zellen unter Stilbamidineinfluss angenommen (GOODMAN u. GILMAN (18), NEWTON (36)).

II. Fragestellung

Nach den heutigen Erkenntnissen ist es kaum noch berechtigt, den aromatischen Diamidinen neben ihrer sicheren protozoaziden Wirkung im menschlichen Organismus auch eine echte und spezifische cytostatische Wirkung zuzuschreiben, wie es 1948 von HEILMEYER u.a. (24) nach wenigen vielversprechenden Fällen von Stilbamidinanwendung bei der Kahlerschen Krankheit angenommen worden war (GOODMAN u. GILMAN, GROSS u. BOCK, NEWTON, KARNOFSKY, DAMESHEK u. GUNZ). Eine unspezifische cytostatische Wirksamkeit der aromatischen Diamidine müsste sich besonders an Geweben mit starker Proliferationstendenz nachweisen lassen, da im allgemeinen durch Cytostatica eine Beeinträchtigung der Zellteilung verursacht wird. Diese Tatsache lässt sich durch die hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Zellgiften in der Phase der Reduplikation und der Teilung des Kernes erklären (DUSTIN (13), GERHARTZ (16)).

Als Organ mit physiologisch sehr hoher Proliferationsaktivität ist im menschlichen Organismus neben den Gonaden und Schleimhäuten besonders das hämopoetische System zu nennen. So ruft zum Beispiel die seinerzeit vorwiegend durchgeführte Plasmocytomtherapie mit dem Cytostaticum Urethan häufig eine ausgeprägte Leukopenie hervor, die von WINTROBE (47) als Folge einer Reifungshemmung in der Granulopoese erklärt wird. Endoxananwendung bei derselben Krankheit verursacht als Nebenwirkung ebenfalls eine Verringerung der Leukocyten im Blut.

Bei mehreren Autoren, die über die klinische Anwendung von Diamidinen berichten, finden sich - neben Angaben über typische Neuropathien und seltene Nierenschädigungen - Beobachtungen über eine mehr oder weniger starke Depression der Zahl der Granulocyten und Erythrocyten im Blut, die als Folge der Behandlung mit Diamidinen angesehen wird (HORSTER u. ESSER (27), HORSTER u. SANDKUEHLER (26), BICHEL u.a. (3), BOLL (8)). In seltenen Fällen wurden Agranulocytosen oder Thrombopenien beschrieben (GOODMAN u. GILMAN, GROSS u. BOCK). Grundsätzlich ist es schwierig, Angaben über Veränderungen des Blutbildes von Plasmocytomkranken nach Stilbamidinverwendung auszuwerten, weil nur selten klar ist, ob zum Beispiel eine Leukopenie die Folge einer Beeinträchtigung der Granulopoese durch den fortschreitenden Tumor oder durch das angewandte Pharmakon war.

Zur Klärung der Frage nach der direkten Einwirkung des Stilbamidins auf die normale Myelopoese, insbesondere nach der Beeinflussung der Proliferationsaktivität der Erythro- und Granuloblasten, werden in dieser Arbeit Untersuchungen am menschlichen Knochenmark in vitro vorgenommen. Gegenüber In-Vivo-Untersuchungen bietet diese Methode den Vorteil, dass genauere experimentelle Bedingungen vorliegen. Es kann hier direkt der Einfluss Stilbamidins auf die Erythro- und Granulo-

poese festgestellt werden, ohne dass unkontrollierbare humorale und nervöse Faktoren die Untersuchung stören oder krankheitsbedingte Veränderungen der Blutbildung einen pharmakologischen Effekt überdecken. Ausserdem können in vitro Knochenmarkzellen desselben Individuums gleichzeitig verschiedenen Dosen des Pharmakons ausgesetzt werden, während Knochenmarkkulturen ohne Zusatz der Substanz als Kontrolle dienen.

III. Methodik

Die Kulturen von menschlichem Knochenmark wurden nach der von ALBRECHT u. BOLL (1) in Anlehnung an die CARREL'sche Technik beschriebenen Methode der Gewebezüchtung im hängenden Koagulum angelegt. Dabei wurde durch Sternalpunktion gewonnenes Knochenmark auf einen koagulierten Tropfen gesetzt, der zu gleichen Teilen aus Hühnerplasma, Hühnerembryonalextrakt und Patientenserum bestand. Darauf wurde ein weiterer Tropfen Serum gegeben. Die durch Paraffin luftdicht abgeschlossenen Kulturen wurden im Brutschrank bei 37° Celsius 1-3 Tage lang bebrütet, dann ausgestrichen, fixiert und nach Pappenheim gefärbt. Für die Zusatzkulturen wurde Stilbamidin dem Koagulum und dem Serumtropfen beigefügt.

Die Untersuchungen wurden an Sternalpunktaten von 3 weiblichen und 2 männlichen Patienten durchgeführt. Dabei handelte es sich in zwei Fällen um weitgehend normales Knochenmark, in einem Fall um das Knochenmark eines Kranken mit Polycythämie und in zwei Fällen um Knochenmark mit starker Plasmazellvermehrung bzw. Plasmocytom.

Vom Sternalmark jedes Patienten wurden folgende Kulturen angelegt (jeweils in mehrfacher Anfertigung, um Schwankungen auszugleichen, die durch die Verschiedenheit der einzelnen Markbröckchen auftreten können):

1. Kontrollkulturen ohne Stilbamidinzusatz
2. Kulturen mit Zusatz von Stilbamidin in den Konzentrationen 0,03 ; 0,3 ; 3,0 mg%.

(In den hier dargestellten Versuchen wurde die Di-Isothionat-verbindung des Stilbamidins* benutzt, die in Pulverform im Handel ist und therapeutisch zur Anwendung kommt. Durch geeignete Auflösung der Substanz in aqua dest. wurden die benötigten Konzentrationen hergestellt).
Die Bebrütungsdauer betrug 24 und 48 Stunden (in einem Fall 24 und 72 Stunden). Ausserdem wurden unmittelbar nach den Sternalpunktionen Originalausstriche angefertigt.
In sämtlichen Ausstrichpräparaten wurden 1000 - 1500 Zellen gezählt. Zur exakten Differenzierung der Zelltypen wurden regelmässig Randgebiete der Kulturen mit aufgelockertem Zellgehalt gewählt. Nach der Differentialzählung von 650 - 1000 weissen Knochenmarkzellen je Kultur und von allen darauf entfallenden anderen Zellen wurden die relativen Zellzusammensetzungen der Zellklassen innerhalb der Erythro- und Granulopoese bestimmt, deren Aenderungen während der Kulturzeit von 1 - 2 (3) Tagen ermittelt und graphisch in Reifungskurven dargestellt. Ausserdem wurde für jede Kultur das Verhältnis der gezählten Granuloblasten und Granulocyten zu den Erythroblasten - der sogenannte G-E-Index - errechnet.

---

* hergestellt von der Firma May & Baker Ltd., Dagenham, England.

Neben der Differentialzählung wurde eine Bestimmung der Mitosen durchgeführt; es wurden die Mitoseindices in den einzelnen Originalen und Kulturen mit und ohne Stilbamidinzusatz ermittelt. Die prozentuale Mitoseverteilung auf die Zelltypen der weissen Reihe wurde in karyologischen Kurven ausgedrückt. Als Mitoseindex wurde die Häufigkeit der Mitosen bei 1000 teilungsfähigen Zellen verstanden; als teilungsfähig wurden in der Granulopoese die Granuloblasten angesehen, d.h. Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Metamyelocyten (nach ROHR (37)); in der Erythropoese sämtliche roten Zellklassen mit Ausnahme der reifen Erythroblasten. Mitosen der Metamyelocyten wurden denen der Myelocyten zugeordnet, da zwischen beiden nur selten ein morphologisch fassbarer Unterschied besteht.

Die Summe aller gezählten Zellen betrug:

in der weissen Reihe:	64000 Zellen
in der roten Reihe:	20000 Zellen
bei den lymphoiden Retikulumzellen, Lymphocyten, Plasmazellen und Megakaryocyten	11000 Zellen

Die Differenzierung erfolgte:

bei der Erythropoese in:

- Proerythroblasten (PR)
- basophile Erythroblasten (BE)
- polychromatische Erythroblasten (PE)
- oxyphile Erythroblasten (OE)
- reife Erythroblasten (RE)

bei der Granulopoese in:

- Myeloblasten (MB)
- Promyelocyten (PM)
- neutrophile, eosinophile und basophile Myelocyten (MC)
- neutrophile Metamyelocyten (MM)
- neutrophile stabkernige Granulocyten (StG)

- neutrophile, eosinophile und basophile segmentkernige Granulocyten (SG).

Die weiter unten in den Reifungskurven angewandten Abkürzungen der einzelnen Zelltypen sind in Klammern aufgeführt.

Es wurde keine besondere Differenzierung der in geringer und verhältnismässig gleicher Zahl vorkommenden eosinophilen und basophilen weissen Zellen durchgeführt. Die eosinophilen und basophilen Myelocyten und Metamyelocyten wurden zu den neutrophilen Myelocyten, die eosinophilen und basophilen Stabkernigen und Segmentkernigen zu den neutrophilen Segmentkernigen gerechnet.

In der Erythropoese lassen sich 5 Kernklassen der Entwicklungsreihe von der Stammzelle bis zum reifen Erythroblasten unterscheiden:

1.) Der Proerythroblast, PR (Kerndurchmesser 13 μ nach WEICKER (46)), der einen kreisrunden Kern besitzt, in dem häufig 2-3 Nukleolen zu erkennen sind. Die Chromatinstruktur ist feinkörnig, der schmale Plasmasaum ist dunkel-basophil, gelegentlich leicht schollig strukturiert.

2.) Der basophile Erythroblast, BE (Kerndurchmesser 10 μ, stark variierend) weist im Kern eine gröbere Struktur auf als der Proerythroblast, besitzt keine Nukleoli und lässt häufig schon eine radiäre Struktur des Chromatins erkennen. Der Plasmasaum ist noch dunkel-basophil, oft zipflig ausgezogen.

3.) Der polychromatische Erythroblast, PE (Kerndurchmesser 6-8 μ, stark variierend) zeigt im scharf konturierten Kern eine grobschollige Struktur mit radspeichenartig ange-

ordneten Chromatinverklumpungen. Das Plasma, das schon hämoglobinhaltig ist, variiert in der Färbung, je nach der Reife, von grau-violett bis grau-rosa.

4.) Der oxyphile Erythroblast, OE (Kerndurchmesser 5 µ) besitzt einen Kern, der dem des polychromatischen Erythroblasten ähnlich ist, sich von diesem jedoch oft durch die fortgeschrittenen Verklumpungserscheinungen unterscheidet. Das homogene Plasma zeigt schon Erythrocytenfarbe.

5.) Der reife Erythroblast, RE hat einen kleinen, pyknotischen, dunkel-violetten Kern ohne erkennbare Struktur, der meistens exzentrisch liegt. Sein Plasma ist das eines Erythrocyten, mitunter noch polychromatisch.

In der Granulopoese wurden die folgenden Zellen unterschieden:

1.) Der Myeloblast, MB (Zelldurchmesser 10 - 16 µ) als Stammzelle der weissen Reihe. Sein runder, oft leicht ovaler Kern, der die Zelle weitgehend ausfüllt, besitzt eine feine, netzförmige Chromatinstruktur, die oft etwas verwaschen erscheint; 2-3 bläulich gefärbte Nukleoli sind meistens deutlich zu erkennen. Der schmale, homogene, zart blaue Protoplasmasaum enthält noch keine azurophilen Granula.

2.) Der Promyelocyt, PM (Zelldurchmesser 16 - 27 µ); der grosse, meist ovaläre Kern hat eine etwas gröbere Struktur als der Myeloblastenkern. Oft sind noch 1-2 Nukleoli erkennbar. Der basophil-grau-rosa gefärbte Protoplasmasaum ist breit und zeigt oft eine perinukleäre, leicht rötliche Aufhellung. Die azurophilen Granula sind grob und liegen mehr oder weniger dicht über Plasma und Kern verteilt.

3.) Der Myelocyt, MC (Zelldurchmesser 14 - 18μ) hat einen runden oder ovalen, manchmal auch leicht eingebuchteten Kern mit gröberer Chromatinstruktur; Nukleoli sind nicht zu erkennen. Der breite Protoplasmasaum ist noch schwach basophil bis oxyphil und weist reichlich neutrophile, eosinophile oder basophile Granula auf.
Es wurden bei den Zählungen nicht zwischen reifen und unreifen Myelocyten unterschieden. Die noch azurophile Granula enthaltenden Zellen wurden zu den Promyelocyten gerechnet.

4.) Der Metamyelocyt, MM (Jugendlicher Granulocyt) besitzt einen bohnenförmigen Kern mit bereits dichterer und z.T. verklumpter Chromatinstruktur; das Plasma ist reif oxyphil, die Granula sind neutrophil, eosinophil oder basophil und fein.

5.) Der stabkernige Granulocyt, StG hat einen Kern von der Form eines gebogenen Stabes. Gelegentliche Verjüngungen, aus denen Kernbrücken resultieren, müssen eine Dicke von mindestens 1/3 der Kernsegmentdurchmesser haben, um schon segmentiert zu sein. Das Protoplasma ist oxyphil, die Granula sind fein und, je nach Zelltyp, spezifisch gefärbt.

6.) Der segmentkernige Granulocyt, SG (Zelldurchmesser 10 - 15μ). Die Struktur der Kernsegmente ist dicht und pyknotisch; die 3-4 Segmente sind durch fadenförmige Kernbrücken verbunden. Das Plasma ist oxyphil, die Granula sind fein und von spezifischer Färbung.

Der Ablauf der Mitose wurde nach BOLL (6) in 6 Phasen unterteilt:

1.) Prophase: die Kernmembran ist aufgelöst, Nukleoli sind verschwunden, die Chromosomen werden z.T. als Fäden sichtbar und weisen eine Knäuelbildung (Spirem) auf.

2.) Frühe Metaphase: die Chromosomen liegen ungeordnet im Teilungsraum (lockeres Spirem).

3.) Späte Metaphase: die Chromosomen sind zum Monaster angeordnet.

4.) Anaphase: die Chromosomen sind im Diaster angeordnet, die Zellform ist noch rund oder ovalär.

5.) Telophase: es haben sich zwei Chromosomenknäuel gebildet (Doppelspirem); die Einschnürung des Zelleibes ist zu erkennen.

6.) Rekonstruktionsphase: die beiden Tochterzellen sind bis auf eine dünne Plasmabrücke, oder völlig voneinander getrennt. In beiden Zellen liegen die Chromosomen noch in Knäueln angeordnet, Kernmembran und Nukleoli sind noch nicht zu erkennen.

Um zu prüfen, ob die durch Differentialzählung ermittelten Unterschiede der Zellverteilung in der Granulopoese zwischen Kulturen mit und ohne Zusatz von Stilbamidin signifikant oder nur zufallsbedingt sind, wurde der χ^2-Test durchgeführt. Es wurden hierzu die Verteilungszahlen von 1000 gezählten weissen Knochenmarkzellen je Ausstrich zugrunde gelegt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde nach den errechneten χ^2-Werten aus statistischen Tabellen (48) entnommen.

Nur wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1% ist, soll eine nicht zufallsbedingte Abweichung der Zellverteilung von den Kontrollkulturen angenommen werden.

IV. Ergebnisse

1.) Zellmorphologie

Das morphologische Bild der einzelnen Zellarten in den Kulturen mit Stilbamidinzusätzen unterscheidet sich nicht nennenswert vom Zellaussehen, das in den Kontrollkulturen gefunden wird. In allen gleich lang bebrüteten Kulturen lassen sich ähnliche Veränderungen der Zellen feststellen, die mit zunehmender Kulturzeit stärker ausgeprägt und häufiger auftreten.

An Kernveränderungen werden beobachtet:

a) bei den Zellen der weissen Reihe:

verwaschene Struktur, Atypien der Kernform wie Eindellungen, Bildung von Ausbuchtungen ("Nasen"), Bisegmentierung der segmentkernigen Granulocyten, Auflösung der Kernmembran, Vorkommen von Kernabsprengungen, Zweikernigkeit. Eine vergleichende morphologische Betrachtung der Granuloblastenmitosen ergibt, dass in den Kontrollkulturen gelegentlich Veränderungen der Kernteilungsfiguren gegenüber den Sofortausstrichen vorkommen. Es werden mitunter - besonders nach 48 Stunden - in der Metaphase unscharfe Abgrenzung oder auch Verklumpung der Chromosomen gefunden, selten finden sich Unregelmässigkeiten in der Chromosomenanordnung der in Teilung befindlichen Zelle. In den Stilbamidinkulturen ist kein vermehrtes Auftreten der Mitoseveränderungen festzustellen. In keinem Fall zeigen sich deutlich pathologische Mitosefiguren.

b) bei den Zellen der roten Reihe:

Kernverformungen, z. T. als Ausdruck der Pyknose oder

Rhexis (Auftreten der "Gänseblümchenform" des Kerns). Kernabsprengungen, Zweikernigkeit und das Vorkommen verklumpter Mitosen werden bei den Erythroblasten häufiger gefunden als bei den weissen Knochenmarkzellen. Besonders die oxyphilen und reifen Erythroblasten weisen in den 48-Stunden-Präparaten Kernveränderungen auf.

An Cytoplasmaveränderungen werden beobachtet:

in der Granulopoese:

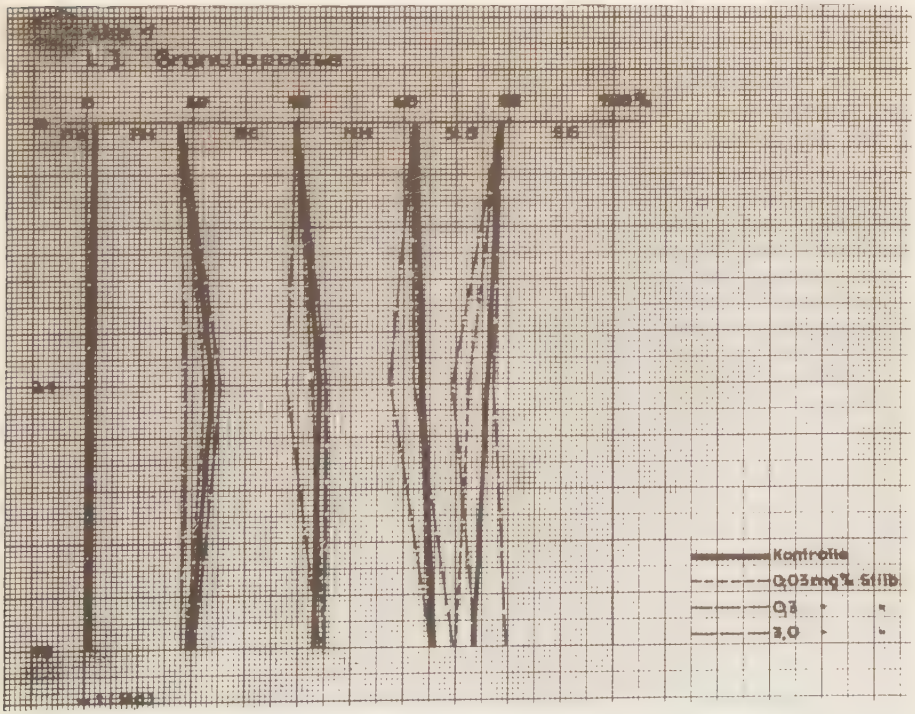
Auftreten von - meist nicht angefärbten - Plasmavakuolen, Plasmakörnelung, Vergröberung der Granulation (besonders bei den Myelocyten). Die Erythroblasten zeigen nur selten deutliche, morphologisch erfassbare Plasmaveränderungen.

2.) Differentialzählung der Knochenmarkzellen.

Die Ergebnisse der Differentialzählungen werden für jeden Versuch getrennt in Reifungskurven der Granulo- und Erythropoese dargestellt. Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellklassen ist als Funktion der Zeit aufgetragen.

Die erste Versuchsreihe (L.J.) wird mit dem Sternalmark einer 68-jährigen Frau, die an einem Magencarcinom leidet, durchgeführt. Zur Zeit der Sternalpunktion zeigt das Blutbild eine mässige hypochrome Anämie bei normaler Leukocytenzahl. Das Myelogramm des Originalausstriches lässt eine mässige Linksverschiebung der Granulo- und Erythropoese erkennen (Abb. 1). Der G-E-Index ist 3.

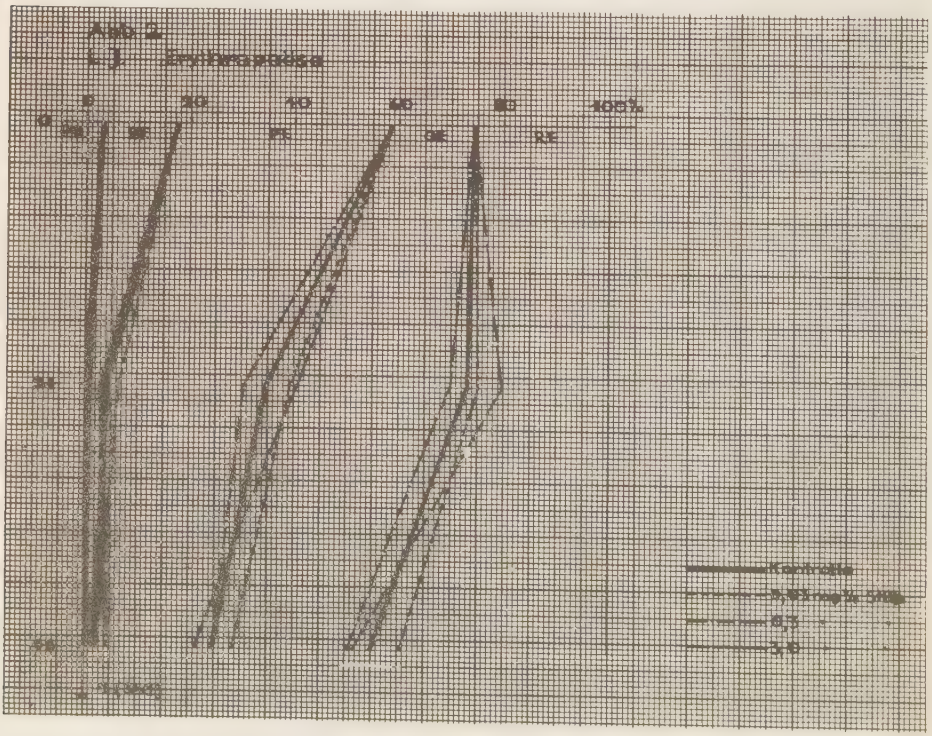
Im Ausstrich der Kontrollkultur findet sich nach 24-stündiger Bebrütungszeit im Vergleich mit dem Sofortausstrich bei Betrachtung der Granulopoese eine Zunahme der Promyelocyten. Die Gesamtzahl der Granuloblasten nimmt gegenüber den reiferen weissen Zellen etwas zu. Nach 2 Tagen Kulturzeit werden mit der prozentualen Verringerung der Myeloblasten und Promyelocyten Zeichen der beginnenden Ausreifung der Granuloblasten erkennbar.



In den Kulturen mit Stilbamidinzusätzen aller drei verwendeter Konzentrationen lassen sich zu keiner Zeit gegenüber den Kontrollkulturen signifikante Unterschiede in der prozentualen Verteilung - d.h. in der Ausreifung - der weissen Knochenmarkzellen erkennen. Die Berechnung

der Signifikanz (s. Tab. 1, Seite 27a) ergibt, dass nur in einer Kultur (Stilbamidin-Konzentration 0,03 mg% nach 48 Std.) eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% unterschritten wird. Sie beträgt jedoch auch hier noch mehr als 1%. Es werden deshalb die ermittelten Unterschiede in der Zellausreifung zwischen Kulturen mit und ohne Stilbamidin als zufallsbedingt angesehen.

In der Erythropoese zeigt sich nach 24 Stunden und - in noch stärkerem Masse - nach 48 Stunden Bebrütungszeit eine ausgeprägte prozentuale Verringerung der Proerythroblasten und der basophilen und polychromatischen Erythroblasten gegenüber den stark zunehmenden reiferen Zellen der roten Reihe.

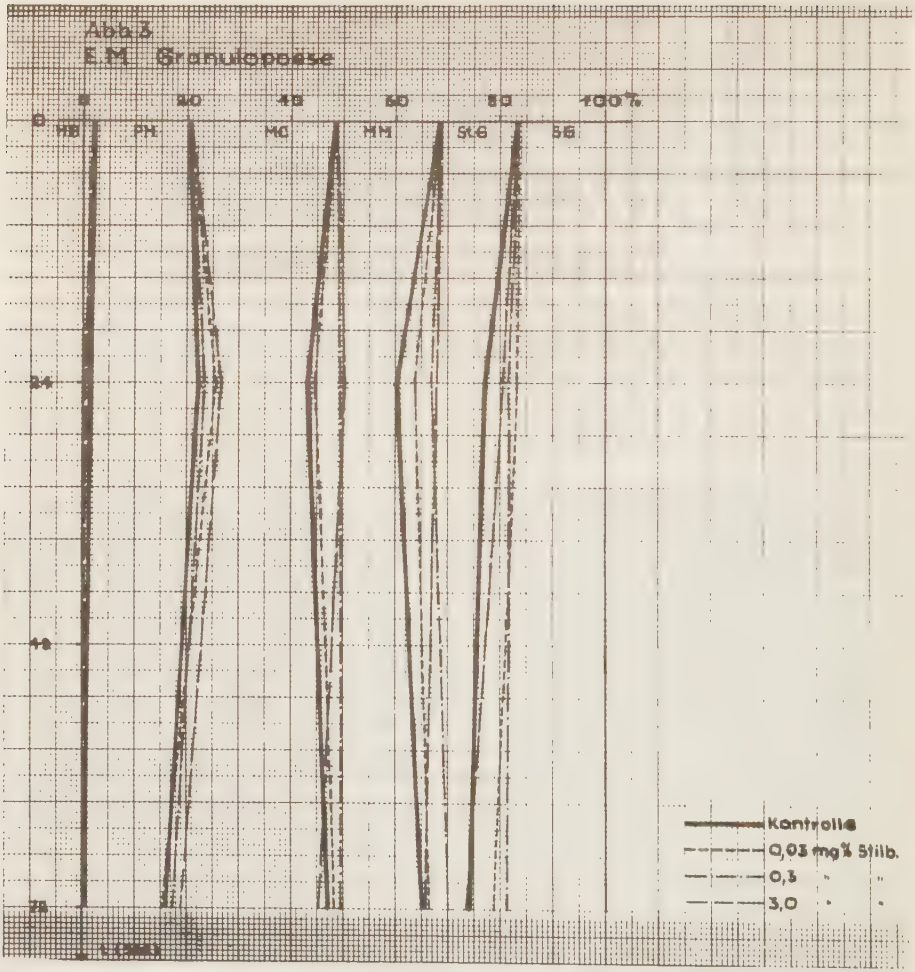


Der Verlauf der Erythroblasten-Ausreifung zeigt unter Stilbamidineinfluss bei keiner der angewandten Konzentrationen eine deutliche Abweichung von den Verhältnissen in den Kontrollkulturen. In allen Fällen findet sich in den Reifungskurven eine mit der Zeit fortschreitende Verschiebung zu den mehr differenzierteren Stadien.

Die G-E-Indices steigen mit zunehmender Bebrütungszeit an. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Werten der Kontroll- und Stilbamidinkulturen. (s. Tab. 2, Seite 29).

Die zweite Versuchsreihe (E.M.) wird mit dem Sternalmark einer 56-jährigen Frau, die an einem Collumcarcinom leidet, durchgeführt.
Zur Zeit der Sternalpunktion ist das Blutbild weitgehend normal. Das Myelogramm des Originalausstriches zeigt eine mässige Linksverschiebung der Erythro- und Granulopoese. (Abb. 3). Der G-E-Index ist 2,5.

Im Ausstrich der Kontrollkultur ist nach 24-stündiger Bebrütungszeit im weissen Zellsystem eine relative Zunahme der Promyelocyten festzustellen. Gleichzeitig findet sich eine Verringerung der Myelocyten sowie - durch den Anstieg der Segmentkernigen bedingt - eine Gesamtzunahme der reiferen weissen Zellen. Nach 3 Tagen hat die prozentuale Vermehrung der Promyelocyten zugunsten derjenigen der Myelocyten abgenommen. Auch an dem weiteren Anstieg der Segmentkernigen wird eine Tendenz zur Ausreifung der weissen Zellen erkennbar.



In den Stilbamidin-Kulturen findet sich nach 24 Stunden bei den Konzentrationen 0,3 und 3,0 mg% eine etwas geringere Zunahme der Segmentkernigen als in der Kontrollkultur. Abgesehen hiervon lassen sich weder nach 1 noch nach 3 Tagen deutliche Veränderungen der Reifungskurven unter Stilbamidineinfluss gegenüber denen der Kontrollen

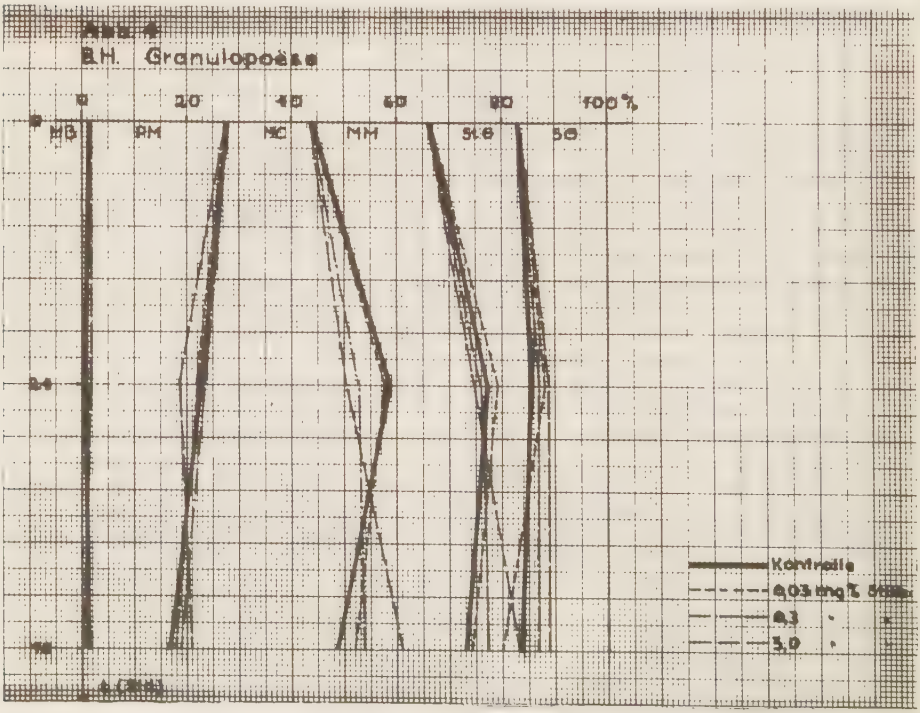
feststellen. Die vorhandenen Abweichungen werden als zufallsbedingt angesehen, da in keinem Fall die Irrtumswahrscheinlichkeit den Wert von 5% unterschreitet. (s. Tab. 1, Seite 27a).

In der Erythropoese zeigt sich - wie im 1. Versuch -, dass mit zunehmender Bebrutungszeit ein starker Anstieg der reiferen Erythroblastenformen erfolgt. Zwischen dem 1. und 3. Tag ist die Zahl der Erythroblasten mit Degenerationserscheinungen am Kern deutlich angestiegen; in den 72-Stunden-Kulturen finden sich sehr haufig Entkernungsfiguren bzw. Kernpyknose und Karyorhexis. Es ist desnalb kaum noch möglich, zwischen oxyphilen und reifen Erythroblasten zu unterscheiden.

Wegen der zu kleinen Zahl der sicher zählbaren Erythroblasten muss auf eine Darstellung der Reifungskurven verzichtet werden. Es lässt sich eine zeitabhängige Zunahme der G-E-Indices feststellen, die durch die Zugabe von Stilbamidin nicht beeinflusst wird. (s. Tab. 2).

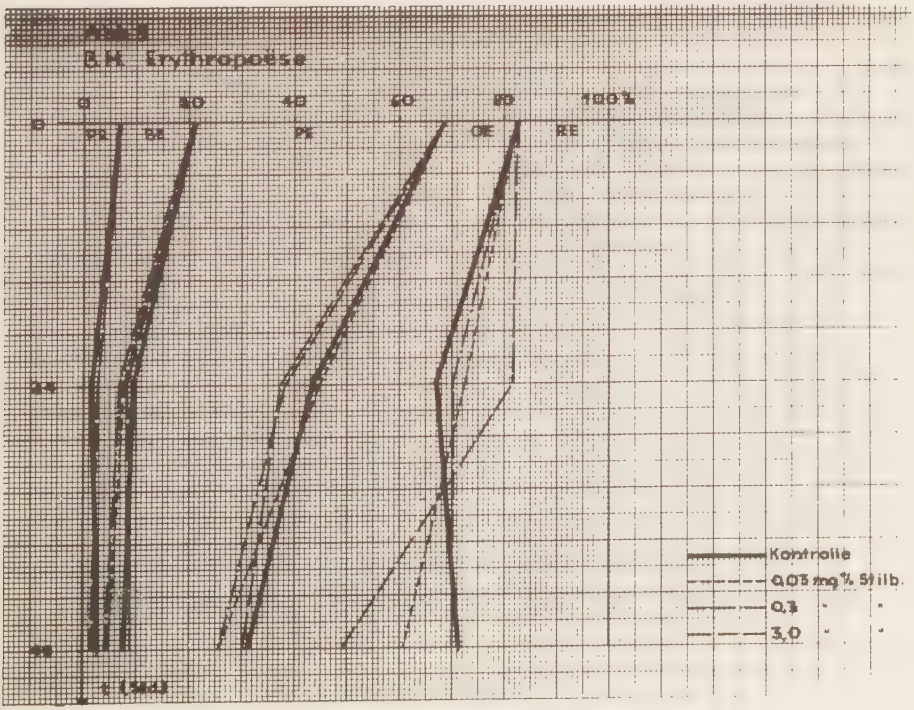
Die dritte Versuchsreihe (B.H.) wird mit dem Sternalmark eines 60-jährigen männlichen Kranken mit einer Polycythämie angelegt.
Zur Zeit der Sternalpunktion zeigt das Blutbild eine mässige Erhöhung der Erythrocytenzahl; der Hämoglobin-Gehalt ist mit 143% und der Färbeindex mit 1,39 gegenüber der Norm stark erhöht. Seit Wochen besteht eine geringe konstante Leukocytose. Die Zahl der Thrombocyten ist normal. Das Myelogramm lässt im Originalausstrich eine starke, angeregte und linksverschobene Erythropoese erkennen. (Abb. 5). Vereinzelt werden megaloblastoide Zellen gesehen,

die wegen ihres in sämtlichen Ausstrichen geringen und relativ konstanten Anteils den normalen Erythroblastenformen zugeordnet werden. Der G-E-Index ist 1,5. Eine mässige Linksverschiebung der Granulopoese drückt sich besonders in einem grossen prozentualen Anteil der Promyelocyten aus. (Abb. 4). Obgleich dieser nach 24 Stunden in der Kontrollkultur etwas abnimmt, steigt doch die Gesamtzahl der Granuloblasten durch die Vermehrung der Myelocyten nach einem Tag beträchtlich an. Im 48-Stunden-Ausstrich findet sich wieder eine Abnahme der Granuloblasten zugunsten der Granulocyten.



Die Reifungskurven der weissen Zellen zeigen auch in dieser Versuchsreihe unter Stilbamidineinwirkung keine wesentliche Abweichung von denjenigen, die ohne Stilba-

midineinfluss ermittelt werden. Allerdings findet sich in einer 48-Stunden-Kultur bei der Stilbamidinkonzentration von 3,0 mg% ein deutlich grösserer Anteil der Myelocyten und ein kleinerer der Stab- und Segmentkernigen als in allen anderen Kulturen mit und ohne Stilbamidinzusatz. Diese Abweichung kann nicht als zufallsbedingt angesehen werden, da $P < 1\%$. Für sämtliche andere Fälle werden die vorhandenen Unterschiede der Zellverteilung zwischen Kontroll- und Stilbamidinkultur als nicht signifikant angesehen, da stets $P > 2{,}5\%$. (siehe Tab. 1).
Im Fall B.H. ist in der Erythropoese (Abb.5) nach 24 und 48 Stunden eine fortschreitende Verschiebung der Erythroblasten zu den reiferen Zellformen erkennbar. Die zeitabhängige Entwicklung wird in diesem Versuch sehr deutlich, weil der Anteil der unreifen Erythroblasten in dem Originalausstrich des hyperplastischen Knochenmarks besonders gross ist.



Die Reifungskurven zeigen unter Stilbamidineinfluss nach 24 Stunden einen ähnlichen Verlauf wie in den Kontroll-Versuchen. Nach dem 2. Bebrütungstag finden sich unterschiedliche Anteile von oxyphilen und reifen Erythroblasten in der Kontroll- und 0,3 mg% Zusatz-Kultur einerseits und den 0,03 und 3,0 mg% Zusatz-Kulturen andererseits. Die Gesamtzahl beider Zellklassen nimmt in sämtlichen Kulturen mit und ohne Zusatz in der Zeit von der 24. bis 48. Bebrütungsstunde gleichmässig zu.

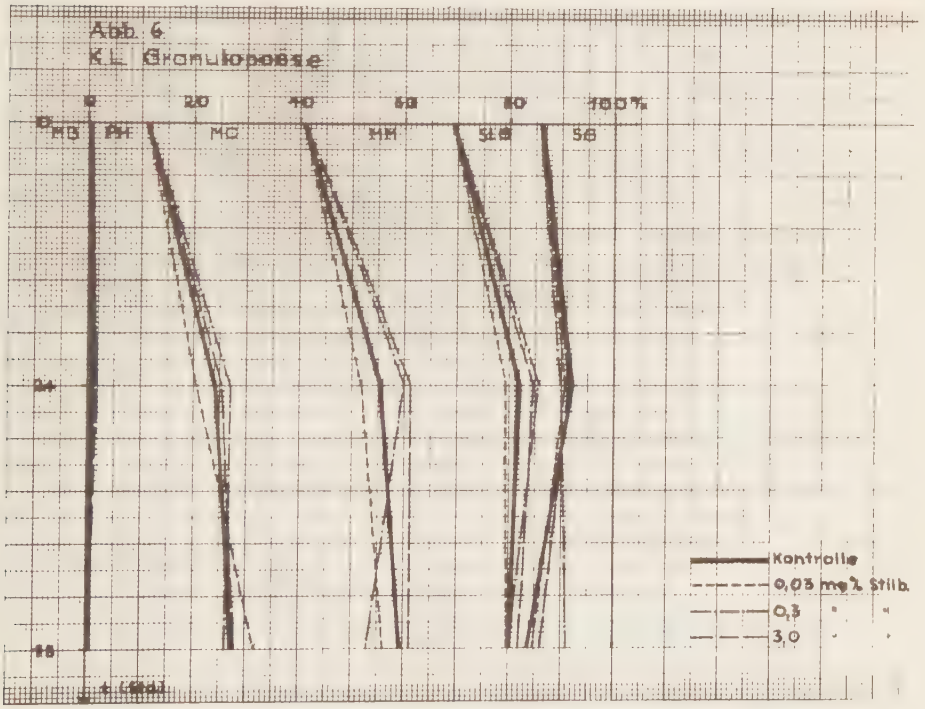
Gegenüber dem Sofortausstrich ist eine zeitabhängige Zunahme der G-E-Indices festzustellen. Alle Kulturen mit gleicher Bebrütungszeit zeigen unabhängig von der Stilbamidinbeifügung weitgehende Uebereinstimmung der G-E-Index-Werte.

Die vierte Versuchsreihe (K.L.) wird mit dem Sternalmark eines 45-jährigen Kranken mit multiplem Gamma-Plasmocytom angelegt.
Zur Zeit der Sternalpunktion zeigt das Blutbild eine ausgeprägte normochrome Anämie bei normaler Leukocytenzahl. Im Myelogramm lässt sich an der grossen Zahl der Plasma- bzw. Plasmocytomzellen der bereits stark fortgeschrittene Zustand der plasmazellulären Neoplasie erkennen.

Auf 1000 weisse Zellen werden 560 Plasmazellen gezählt. Der Anteil der Erythroblasten an der Gesamtzellzahl ist stark verringert, wodurch der G-E-Index auf 7 erhöht ist.

In der Granulopoese ist eine Linksverschiebung erkennbar, die sich besonders in einem grossen Myelocytenanteil aus-

drückt. Im Ausstrich der Kontrollkultur nach 24 Stunden findet sich eine Gesamtzunahme der Granuloblasten, die vorwiegend durch den Anstieg der Promyelocyten verursacht ist. Nach 2 Tagen Bebrütungszeit hat sich der Granuloblastenanteil wieder verringert, ein prozentualer Anstieg der Segmentkernigen ist erkennbar.



Die Reifungskurven der Stilbamidin-Kulturen zeigen weder nach 24 noch nach 48 Stunden Bebrütungszeit signifikante Abweichungen von denen der Kontrollen. Nur in einer Zusatz-Kultur - Stilbamidin-Konzentration 0,3 mg% nach 48 Stunden - ergibt sich für die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ein kleinerer Wert als 2,5%, der jedoch noch

grösser ist als 1%. In allen anderen Fällen ist $P > 2,5\%$. Die vorhandenen Unterschiede zwischen den Reifungsverhältnissen der Kulturen mit und ohne Stilbamidin werden deshalb als zufallsbedingt angesehen.

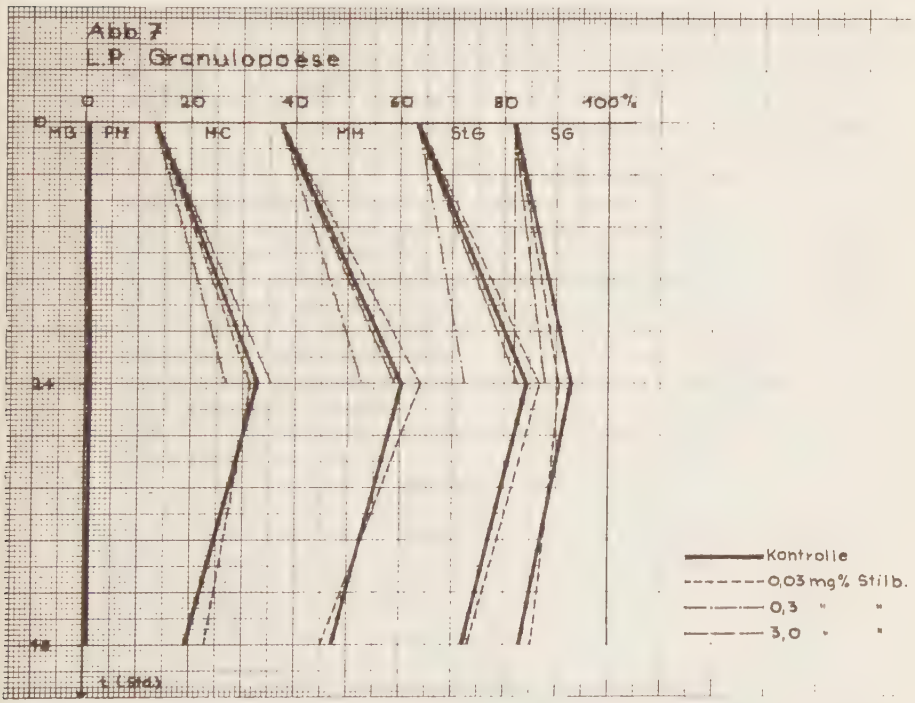
Wegen der geringen Anzahl der zählbaren Erythroblasten ist es nicht möglich, die Reifungsverhältnisse des roten Zellsystems quantitativ darzustellen. Eine qualitative Betrachtung ergibt, dass die Ausreifung der Erythroblasten - ähnlich wie in den anderen Versuchsreihen - zeit- aber nicht dosisabhängig ist.

Die G-E-Indices nehmen in den Kulturen nach 24 und 48 Stunden gegenüber dem Originalausstrich zu. Zwischen den Werten aller Kulturen mit gleicher Bebrütungszeit zeigen sich keine deutlichen Veränderungen. (Tab. 2)

Die fünfte Versuchsreihe (L.P.) wird mit dem Sternalmark einer 28-jährigen Frau, die an einer Entzündung der Harnwege leidet, durchgeführt.
Zur Zeit der Sternalpunktion zeigt das Blutbild eine mässige normochrome Anämie bei geringer Leukocytose.
Im Myelogramm findet sich eine Vermehrung der retikulären Plasmazellen; auf 1000 weisse Zellen werden 280 Plasmazellen und nur 90 Erythroblasten gezählt. Die Erythropoese ist stark zurückgedrängt. Sie weist mit einem deutlichen Ueberwiegen der polychromatischen Zellform eine Linksverschiebung auf. Der G-E-Index ist 11.

Die Granulopoese zeigt ebenfalls eine mässige Linksverschiebung. In den Kontrollkulturen drückt sich nach 24 Stunden eine Gesamtzunahme der teilungsfähigen weissen

Zellen besonders in der angestiegenen Promyelocytenzahl aus.



In den Reifungskurven der Stilbamidin-Kulturen findet sich zur gleichen Zeit eine ähnlich starke Zunahme der Granuloblasten, die allerdings bei einer Stilbamidin-Konzentration von 0,3 mg% nicht so ausgeprägt ist wie in den anderen Kulturen.

Nach dem 2. Bebrütungstag lässt sich eine Verringerung des Promyelocytenanteils und damit der Gesamtzahl der Granuloblasteń sowohl in der Kontroll- als auch in der Stilbamidin-Kultur erkennen. Es sind zu diesem Zeitpunkt nur Zu-

satzkulturen mit einer Stilbamidin-Konzentration von 0,03 mg% angelegt worden.

Bei den Kulturen mit Stilbamidin-Zusätzen von 0,03 und 0,3 mg% werden nach 24 Stunden in der Differentialzählung Unterschiede im Anteil der stab- bzw. segmentkernigen Granulocyten gegenüber den Kontrollkulturen bemerkbar, wodurch hohe χ^2-Werte, d.h. geringe Irrtumswahrscheinlichkeiten verursacht werden. (s. Tab. 1). In beiden Kulturen mit Stilbamidin-Zusatz von 3,0 mg% ist $P > 5\%$. Die geringe Zahl der Erythroblasten erlaubt keine quantitative Darstellung der Reifungsverhältnisse des roten Zellsystems. Die G-E-Indices nehmen in den Kulturen sehr hohe Werte an. Es lässt sich keine zusatzbedingte Aenderung der G-E-Indices erkennen.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Reifungskurven aller 5 Versuchsreihen ergibt, dass in 4 von 5 Fällen in den Kontrollkulturen nach 24 Stunden Bebrütungszeit ein prozentualer Anstieg der gesamten Granuloblastenzahl und eine Abnahme der Granulocyten vorliegt. Im Fall E.M. lässt sich nur eine Zunahme des Promyelocytenanteils feststellen, während die Gesamtzahl der teilungsfähigen weissen Zellen etwas erniedrigt ist.

Nach dem 2. (3.) Bebrütungstag macht sich in allen ausgewerteten Versuchsreihen eine Ausreifung der weissen Zellen bemerkbar, die sich in den Reifungskurven 1.) an der prozentualen Verringerung der Granuloblasten - oder zumindest der Promyelocyten - und 2.) in dem relativen Anstieg der Segmentkernigen ausdrückt.

Tabelle I: Werte der Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) in % für die Reifungskurven der Granulopoese.

P wird nach dem χ^2-Test berechnet. Dabei ist:

a = ermittelte Zahl eines Zelltyps in einer Zusatzkultur in ‰

b = ermittelte Zahl eines Zelltyps in einer Kontrollkultur in ‰

$m = \frac{a + b}{2}$

$\Delta = a - m$

χ^2 = Summe der Werte $\frac{\Delta^2}{m}$

In der Tabelle wurden nur die Werte von $\frac{\Delta^2}{m}$, χ^2 und P für die einzelnen Versuche, Stilbamidinzusatz-Konzentrationen (in mg %) und Bebrütungszeiten (in Stunden) angegeben.

		24			48		
	Zelltyp	0,03	0,3	3,0	0,03	0,3	3,0
L.J.	MB	1,80	1,50	1,50	4,00	0,17	0,00
	PM	0,02	1,94	0,04	0,01	0,00	0,08
	MC	0,00	0,19	0,17	0,56	0,25	0,15
	MM	0,08	0,00	0,13	0,23	0,46	0,27
	StG	3,17	0,21	0,90	7,00	0,00	0,55
	SG	1,25	4,22	0,07	1,42	0,03	2,02
		χ^2=6,32	χ^2=8,06	χ^2=2,81	χ^2=13,22	χ^2=0,91	χ^2=3,07
		P > 20	P > 10	P > 70	P > 1	P > 95	P > 60
E.M.*	MB	0,27	0,00	1,28	0,00	0,80	1,00
	PM	1,42	0,07	2,65	0,57	0,00	0,02
	MC	0,40	2,85	0,29	0,22	0,16	0,49
	MM	0,26	0,00	0,05	0,01	0,94	0,64
	StG	1,97	0,43	1,32	1,84	0,81	0,18
	SG	0,65	2,13	1,54	1,87	7,70	0,02
		χ^2=7,97	χ^2=5,48	χ^2=7,13	χ^2=4,51	χ^2=10,41	χ^2=2,35
		P > 10	P > 30	P > 20	P > 40	P > 5	P > 70

* bei der Versuchsreihe E.M. betrugen die Bebrütungszeiten 24 und 72 Stunden!

		24			48		
	Zell-typ	0,03	0,3	3,0	0,03	0,3	3,0
B.H.	MB	0,00	0,75	0,00	0,27	0,00	0,75
	PM	0,01	0,04	1,86	0,01	0,49	1,89
	MC	0,01	2,55	1,64	0,96	0,59	4,25
	MM	0,70	3,65	5,23	0,62	0,04	0,21
	StG	0,04	0,10	2,48	7,60	0,76	9,11
	SG	0,90	0,03	1,08	1,99	0,94	4,23
		χ^2=1,66	χ^2=7,12	χ^2=12,29	χ^2=11,45	χ^2=2,82	χ^2=20,44
		P > 80	P > 20	P > 2,5	P>2,5	P > 70	P>0,1
K.L.	MB	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	PM	1,64	0,57	0,11	0,24	2,41	0,03
	MC	0,00	0,20	1,31	0,26	0,77	0,25
	MM	0,18	0,00	0,27	1,08	0,02	0,00
	StG	0,14	9,90	9,90	0,60	0,78	0,00
	SG	0,42	0,72	0,91	0,06	9,55	0,41
		χ^2=2,48	χ^2=11,49	χ^2=12,60	χ^2=2,34	χ^2=13,63	χ^2=0,79
		P > 70	P>2,5	P>2,5	P > 80	P > 1	P>97,5
L.P.	MB	1,33	0,25	1,33	0,00		
	PM	0,00	2,71	0,77	1,20		
	MC	0,96	0,37	1,09	2,93		
	MM	0,00	1,86	0,16	1,10		
	StG	13,80	0,55	2,92	0,32		
	SG	0,72	19,50	4,70	0,87		
		χ^2=16,51	χ^2=25,24	χ^2=10,97	χ^2=6,42		
		P > 0,5	P < 0,05	P > 5	P > 20		

Die gleichen Reifungsverhältnisse lassen sich bei allen 5 Versuchsreihen in den Kulturen mit 3 unterschiedlich konzentrierten Stilbamidin-Zusätzen erkennen. Bei der grossen Mehrheit der Stilbamidin-Kulturen werden nur zufallsbedingte Unterschiede der Zellreifungsverhältnisse gegenüber den Kontrollkulturen festgestellt. Nur in einer Zusatzkultur der Versuchsreihe B.H. und in zwei Zusatzkulturen der Reihe L.P. wird eine Zellzusammensetzung der Granulocyten gefunden, die sich deutlich von derjenigen der Kontrollkultur unterscheidet.

Die Differentialzählung der Erythroblasten erlaubt nur in den Versuchsreihen L.J. und B.H. eine begründete quantitative Darstellung. In den übrigen Fällen kann wegen der zu kleinen Gesamtzahl der roten Knochenmarkzellen nur eine qualitative Beurteilung der Zellreifung durchgeführt werden, die sich jedoch in ihrer Aussage von den Ergebnissen in den Fällen L.J. und B.H. nicht wesentlich unterscheidet. Es zeigt sich, dass die Verschiebung der Zellzusammensetzung - und damit die Reifung der Erythroblasten in vitro - nur zeitabhängig ist und von Stilbamidinbeifügungen nicht beeinflusst wird.

Eine Beurteilung der Proliferationsverhältnisse der Plasmazellen ist in den Versuchsreihen L.J., E.M. und B.H. wegen der sehr geringen Anzahl der differenzierten Plasmazellen nicht möglich. In den beiden Fällen mit starker Plasmazellvermehrung (K.L. und L.P.) findet sich nach 24-stündiger Kulturzeit eine Verringerung der auf 1000 weisse Zellen gezählten Plasma- bzw. Plasmocytomzellen gegenüber den Sofortausstrichen auf 1/3, nach 48 Stunden auf 1/4.

In den Stilbamidin-Kulturen ist die Abnahme der Plasmazellen nur wenig stärker ausgeprägt. Wegen der zu geringen Zellzahl erfolgt hier keine weitere Erörterung der Stilbamidineinwirkung auf die Plasmazellen in vitro.

Die Differentialzählung der Reticulumzellen, Lymphocyten und Megakaryocyten erbringt in den Kulturen keine wesentlichen zeit- oder zusatzabhängigen Veränderungen und bleibt wegen der geringen Zellzahl unberücksichtigt.

Das Zahlenverhältnis von Granuloblasten und Granulocyten zu Erythroblasten - der G-E-Index - zeigt in den Sofortausstrichen der Sternalpunktate der 5 Patienten Werte von unterschiedlicher Grösse. (s. Tab. 2).
In allen Versuchsreihen findet sich in den Kulturen nach 24 und 48 Stunden eine Zunahme der G-E-Indices. Ein deutlicher Einfluss von Stilbamidin auf die Entwicklung der Zahlenverhältnisse von weissen zu roten Knochenmarkzellen lässt sich in keinem Fall feststellen.

Tabelle 2

G-E-Indices in Knochenmarkkulturen mit und ohne Zusatz von Stilbamidin

Std.	0	24				48				72			
mg% Stilb.	0	0	0,03	0,3	3,0	0	0,03	0,3	3,0	0	0,03	0,3	3,0
L.J.	3	6	6	5,5	7	8	7	8	5,5				
E.M.	2,5	4	3	3	3					4	5	8	4
B.H.	1,5	2	1,75	2	2,5	2,5	3	2,5	2				
K.L.	7	10	7	11	9	11	12	10	13				
L.P.	11	18	13	21	15								

) Differentialzählung der Mitosen (Tab. 3)

Der Mitoseindex (MI) der Granulopoese zeigt in allen 5 Fällen in den Kontrollkulturen nach 24 Stunden einen Anstieg auf das 2-3-fache gegenüber dem Originalausstrich, um nach dem 2. Bebrütungstag wieder ungefähr auf den Originalwert abzufallen. Im Fall E.M. ist die Verringerung von MI nach 72 Stunden nicht so stark ausgeprägt. Der Zusatz von Stilbamidin bewirkt in den 3 benutzten Konzentrationen in allen Versuchsreihen eine ungefähr gleiche Herabsetzung der Mitoseindices gegenüber denen der Kontrollkulturen auf etwa 2/3. Diese Erniedrigung der Mitoseindices erweist sich als unabhängig von der Konzentration des Zusatzes und zeigt keine deutliche Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer.

Es fällt auf, dass in den beiden Versuchsreihen mit den Sternalpunktaten, die Plasmazellvermehrung zeigen (Fall L.P. und K.L.), sämtliche Granuloblasten-Mitoseindexwerte um das 2-3-fache über denen der Versuchsreihen mit Knochenmark ohne Plasmazellvermehrung liegen.
In den Relationen zwischen den Mitoseindexwerten der Original-, Kontroll- und Stilbamidin-Kulturen zeigen sich jedoch keine Unterschiede zwischen Sternalmark mit und ohne erhöhter Zahl der Plasmazellen.

In allen Fällen liegen die Mitoseindices der Promyelocyten höher als die der Myelocyten. Die Verminderung der Miterate betrifft in sämtlichen Stilbamidin-Kulturen die teilungsfähigen Zellklassen in relativ gleichem Ausmass.

Tabelle 3

Mitoseindices der Granuloblasten

	Stilbamidin-Konzentration (mg%)					St/Ko
	0	0,03	0,3	3,0	D	
L.J. 0 Std.	5,2					
24 "	13,2	12,5	11,2	8,2	10,6	0,80
48 "	5,1	4,7	4,4	3,8	4,3	0,77
E.M. 0 Std.	4,4					
24 "	13,7	8,5	7,7	9,8	8,7	0,64
72 "	10,4	3,1	3,4	4,6	3,7	0,35
B.H. 0 Std.	5,5					
24 "	10,7	5,6	8,8	8,9	7,8	0,73
48 "	4,4	2,8	2,4	2,1	2,5	0,57
K.L. 0 Std.	11,0					
24 "	22,2	12,0	7,9	8,5	9,4	0,42
48 "	15,1	12,0	-	11,0	11,5	0,76
L.P. 0 Std.	15,0					
24 "	20,6	13,0	12,5	13,5	13,0	0,66
48 "	12,5	7,1	-	-	7,1	0,56

D = Mittel der Mitoseindexwerte aller Stilbamidinzusätze

St/Ko = Quotient der Mitoseindexwerte mit und ohne Stilbamidinzusatz

Mit Hilfe der ermittelten Mitosen werden caryologische Kurven 1. für die Kontrollkulturen, 2.) für die Kulturen mit Stilbamidinzusätzen angefertigt, um die Zusatzunabhängigkeit der Mitosephasenverteilung aufzuzeigen. (Abb. 8).

Eine gemeinsame Beurteilung der Mitosephasen sämtlicher Stilbamidin-Kulturen bzw. sämtlicher Kontrollkulturen erscheint dadurch gerechtfertigt, dass bei der Differentialzählung der Kernteilungsfiguren eine Unabhängigkeit der Phasenverteilung von der Zusatzdosis herausgefunden wurde.

Die Gesamtzahl der Mitosen beträgt in den Kontrollkulturen der 5 Versuchsreihen 94, in sämtlichen Stilbamidin-Kulturen 184. (s. Tab. 4).

Tabelle 4

Verteilung der Mitosephasen in der Granulopoese mit und ohne Zusatz von Stilbamidin (in %)

	Pro-	fr.Meta-	sp.Meta-	Ana-	Telo-	Rekonstr'Phase
Kontrollk.	20	34	24	17	3	2
Stilb.Kult.	16	36	26,5	14	4,5	3

Zu 1:

Das Zahlenverhältnis von weissen zu roten Knochenmarkzellen beträgt nach ROHR (37) im normalen Myelogramm des Sternalpunktates etwa 3:1. In den vorliegenden Untersuchungen finden sich in den Fällen L.J. und E.M. Werte von 3:1 und 2,5:1. Bei dem Patienten B.H., der an einer Polycythämie leidet, zeigt der auf 1,5:1 erniedrigte G-E-Index die Zunahme der Erythroblasten im Knochenmark an. In den beiden Fällen mit starker Plasmazellvermehrung (K. L. und L.P.) lassen die deutlich erhöhten G-E-Indices mit Werten von 7:1 und 11:1 auf eine besonders ausgeprägte Zurückdrängung der Erythropoese im Sternalmark schliessen.

Die Ermittlung der G-E-Indices in allen Kontroll- und Stilbamidin-Kulturen ermöglicht die Beurteilung der Zeit- und Zusatzabhängigkeit von quantitativen Veränderungen im Verhältnis von Granulo- zu Erythropoese. In der Untersuchung der G-E-Indices aller 5 Versuchsreihen zeigt sich, dass mit zunehmender Bebrütungszeit in den Kontrollkulturen eine relative Abnahme der roten gegenüber den weissen Knochenmarkzellen erfolgt. (Tab.2).
Nach Stilbamidineinwirkung wird keine Veränderung dieser Beobachtung festgestellt, so dass nicht auf eine gesonderte quantitative Beeinträchtigung der Granulo- oder Erythropoese durch Stilbamidin geschlossen werden kann.

Zu 2:

Bei der Betrachtung der Reifungskurven der Granulopoese ergibt sich für die Kontrollkulturen aller Versuchsreihen folgendes Bild: in den ersten 24 Stunden der Bebrütung überwiegt die Zellteilung der Granuloblasten gegenüber der Ausreifung in differenzierte Zellformen (Stab- und Segmentkernige), so

dass sich in allen Fällen mit der Zunahme der Granuloblasten oder zumindest der Promyelocyten eine Linksverschiebung in der Granulopoese zeigt.

Mit Nachlassen der reproduktiven Aktivität der Knochenmarkzellen in vitro kommt es dann zwischen der 24. und 72. Bebrütungsstunde zu einem Ueberwiegen der Zellausreifung, die sich in einer Abnahme der Granuloblasten - besonders der Myeloblasten und Promyelocyten - und in einem prozentualen Anstieg der Segmentkernigen zu erkennen gibt.

Dieser nach 2- bzw. 3-tägiger Bebrütung zu beobachtende Effekt wird in vitro einerseits durch die Verhinderung des Nachschubs von Stammzellen und der Ausschwemmung von reifen Granulocyten verstärkt; andererseits wird der Effekt dadurch vermindert, dass es nach dem ersten Bebrütungstag zu einer Linksverschiebung der Zellen kommt, und überdies die Lebensdauer der Segmentkernigen nur etwa 15 Stunden beträgt (FLIEDNER (15)), während die Lebensdauer der Granuloblasten als unendlich lang, d.h. praktisch, als länger als die hier angewandten Bebrütungszeiten angesehen werden muss (WEICKER (46)).

Die hier in der Mehrzahl der Fälle übereinstimmend beobachtete zeitabhängige Verschiebung der Zellzusammensetzung in der Koagulumkultur kann nicht als Ausdruck einer Beeinflussung der Zellverteilung durch das Kulturmedium und damit als Kunstprodukt angesehen werden. Nach den Untersuchungen von BOLL (7,9) und BOLL und FUCHS (10) wie auch nach den Angaben von FIESCHI (14), GERHARTZ (16) u.a. zeigen sich im Laufe der ersten Bebrütungstage in den Knochenmarkkulturen charakteristische Veränderungen der Zellverteilung, die mit den hier gefundenen Reifungsverhältnissen übereinstimmen. Sie werden als das Ergebnis der natürlichen Teilung und Reifung der vom Mutterboden gelösten Knochenmarkzellen aufgefasst. Hinzu kommt die

schon erwähnte Beeinflussung der Zellzusammensetzung durch den Mangel an Zellnachschub bzw. Zellausschwemmung im geschlossenen Kultursystem. Diese empirisch ermittelte Gesetzmässigkeit der Zellentwicklung in vitro konnte bestätigt werden als es BOLL und FUCHS 1961 gelang, die zeitabhängigen Umwandlungen der Zellverteilung in der Koagulumkultur mathematisch befriedigend vorherzusagen (10, 11).

Die in den Kontrollkulturen gefundene charakteristische Entwicklung der Zellzusammensetzung erfährt unter Stilbamidineinfluss keine Aenderung, so dass die Reifungskurven von Kulturen mit und ohne Zusatz des Pharmakons in den einzelnen Versuchsreihen nur zufallsbedingte Unterschiede zeigen. Es kann auch durch Steigerung der Stilbamidin-Konzentration um das 10- bzw. 100-fache keine Veränderung der besonderen Proliferationseigenschaften der Knochenmarkzellen in der Koagulumkultur verursacht werden.

Die im Fall L.P. bei 2 Stilbamidin-Kulturen nach 24 Stunden gefundenen, rechnerisch signifikanten Abweichungen der Reifungskurven von denjenigen der Kontrollkulturen werden nicht als Ausdruck einer Stilbamidineinwirkung angesehen, da sie 1.) nur bei den beiden niedrigen Zusatzkonzentrationen (0,03, 0,3 mg%) - und dort mit unterschiedlicher Veränderung der Zellzusammensetzung - zu finden sind, bei der höchsten verwendeten Stilbamidindosis (3,0 mg%) jedoch nicht auftreten und da sie 2.) in der 48-Stundenkultur bei der Zusatzdosis 0,03 mg% nicht mehr feststellbar sind. Die in der Versuchsreihe B.H. ermittelte signifikante Abweichung der Reifungskurve 3,0 mg%/48 Stunden von der Kontrollkurve kann nicht erklärt werden. Eine besondere Berücksichtigung dieses Befundes erscheint jedoch nicht gerechtfertigt, da in den übrigen Reihen die Unterschiede in der Zellzusammensetzung zwischen Kontrollkulturen und 3,0 mg%-Zusatzkulturen hohe Irrtumswahrscheinlichkeiten aufweisen.

Zu 3 a):

Die Beeinflussung der Proliferation der Knochenmarkzellen kann sich nicht nur in einer Veränderung der Zellreifungsverhältnisse, sondern auch in einer Vermehrung oder Verminderung der Teilungsvorgänge zeigen. Ein Mass für die Teilungsaktivität bietet - unter bestimmten Voraussetzungen - der Mitoseindex (MI). Er beinhaltet ausser der Mitoserate, d.h. der Zahl der sich pro Zeiteinheit teilenden Zellen (m), noch die durchschnittliche Dauer der einzelnen Mitosen (t_m).

$$MI = m \cdot t_m$$

Einer veränderten Mitoserate liegt also nur bei konstanter Mitosedauer - die bei Zusätzen von Pharmaka nicht unbedingt vorausgesetzt werden kann - eine veränderte Teilungsaktivität zugrunde. Ausserdem muss eine gewisse Abhängigkeit des Mitoseindex-Wertes von der prozentualen Zusammensetzung der Granuloblastenklassen bestehen, da - nach Untersuchungen von JOURNOUD (31) - die unreiferen Zellen die Mitose langsamer durchlaufen als die reiferen Formen. Die durchschnittliche Mitosedauer der Granuloblasten wird von JOURNOUD mit ca. 2 Stunden, von SALERA u. TAMBURINO (38) mit 2-3 Stunden, von BOLL (6) nach ihren Lebendbeobachtungen mit 1,3 Stunden angegeben.

Von ROHR wird nach seinen Untersuchungen und Zitaten anderer Autoren ein Mitoseindex der Granulopoese von 5-8‰ als normal bezeichnet (37).
In den vorliegenden Untersuchungen werden im Sofortausstrich für die Granuloblasten in 3 Fällen Mitoseindex-Werte von 4,4; 5,2 und 5,5‰ errechnet. In den beiden Fällen mit starker Vermehrung der Plasmazellen im Knochenmark werden in den Originalausstrichen Mitoseindices von 11 und 15‰ ermittelt.

In den 24-Stunden-Kontrollkulturen aller 5 Versuchsreihen zeigt sich übereinstimmend ein Anstieg der Mitoseindices auf das 2- bis 3-fache der Ausgangswerte. Dieses Ergebnis muss als Ausdruck der in Kultur erhöhten Teilungsaktivität der Granulo-

blasten betrachtet werden (FIESCHI, BOLL).

Nach dem 2. Bebrütungstag fallen die Mitoseindex-Werte mit dem Nachlassen der reproduktiven Aktivität des weissen Zellsystems in vitro wieder auf ihre Ausgangswerte zurück.

Im Fall E.M. findet sich nach 72 Stunden nur eine relativ geringe Abnahme der Mitosehäufigkeit. In dieser Kultur fällt gleichzeitig ein hoher prozentualer Anteil der Prophasen an der Summe aller Kernteilungsfiguren auf; er beträgt 55% gegenüber dem sonst übereinstimmend festgestellten Wert von ca. 20%. Da in den 72-Stunden-Ausstrichen gehäuft Zellen mit degenerativ veränderten, in der Struktur aufgelockerten Kernen vorkommen, ist wahrscheinlich, dass zu viele Prophasen gezählt werden. Reduziert man den Prophasenanteil nachträglich auf den sonst gefundenen Wert von 20%, so beträgt MI nur noch 6‰.

In den Kulturen mit unterschiedlich konzentrierten Stilbamidinzusätzen sind nach 24 Stunden die Mitoseindex-Werte gegenüber den Kontrollkulturen durchschnittlich auf 2/3 herabgesetzt. Dieser Mittelwert wird auch nach 48-stündiger Bebrütungszeit gefunden.

Die Verminderung des Mitoseindex erweist sich somit einerseits als abhängig vom Stilbamidinzusatz, andererseits als unabhängig von der Bebrütungszeit und der Zusatzdosis.

Zu 3 b):

Ein Vergleich zwischen den Mitoseraten der Myeloblasten, Promyelocyten und Myelocyten ergibt in den Originalausstrichen, in den Kontroll- und Stilbamidin-Kulturen ein ähnliches Bild; stets werden die Promyelocyten häufiger in Mitose vorgefunden als die Myelocyten.

Zu 4:

In der prozentualen Verteilung der Mitosephasen verursacht die Stilbamidineinwirkung keine Abweichung von den Verhältnissen der Kontrollkulturen. Eine Blockierung des Mitoseablaufs durch Stilbamidineinfluss ist also auszuschliessen. Eine Veränderung der Mitosedauer unter Stilbamidineinwirkung müsste alle Mitosephasen in gleichem Verhältnis betreffen.

Zu 5:

An morphologischen Veränderungen lässt sich in den Kulturen mit Stilbamidinzusatz kein vermehrtes Auftreten der gelegentlich erkennbaren Mitoseverklumpungen und der Zweikernigkeit gegenüber den Kontrollkulturen feststellen. Das Vorkommen morphologischer Veränderungen, die das Zellplasma oder die Zellkerne (in Ruhe oder in Mitose) betreffen, nimmt mit der Bebrütungsdauer zu. Es wird als Ausdruck der schon während des 1. Bebrütungstages einsetzenden Degenerationserscheinungen der Zellen in vitro angesehen. In den Plasmocytomzellen der Kulturen mit Stilbamidinzusatz finden sich die von SNAPPER (42,43) beschriebenen basophilen Einschlusskörperchen im Cytoplasma. Ähnliche"Granula" werden in den übrigen Knochenmarkzellen nicht beobachtet.

Betrachtet man alle am fixierten Präparat erfassbaren Daten und Befunde zur Proliferationsaktivität (G-E.Indices, Reifungskurven, Mitoseindices, Mitoseverteilung auf die Reifungsstufen, caryologische Kurven und allgemeine morphologische Veränderungen), so bleibt die zeit- und dosisunabhängige Herabsetzung der Mitoseindices der einzige Ausdruck einer Stilbamidineinwirkung auf die Granulopoese. Dieser Effekt kann nun entweder durch Verkürzung der Mitosedauer oder durch Verringerung der Teilungsaktivität, d.h. durch Verlängerung der Generationszeit (t_G) erklärt werden; denn die Teilungsaktivität verhält sich im allgemeinen zur Generationszeit einer Zell-

klasse umgekehrt proportional. Da t_G als Summe von Mitosezeit und Interkinesedauer (t_i) angesehen werden muss, ergibt sich für den Mitoseindex:

$$MI = \frac{t_m}{t_m + t_i}$$

Bei der hier angewandten Untersuchungsmethodik am fixierten Präparat lässt sich keine der beiden Möglichkeiten mit Sicherheit ausschliessen. Unmittelbar zu bestimmende Angaben über die Ursachen der Verringerung der Mitoseindices bei Stilbamidineinwirkung sind nur durch Lebendbeobachtung der Granuloblasten in der Stilbamidin-Kultur oder durch DNS-Markierungsmethoden zu gewinnen. Es lassen sich jedoch bei Zugrundelegung der hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse und anderer Beobachtungen weitere Aussagen machen, die zur Erklärung der festgestellten Stilbamidinwirkung dienen können.

Unter den cytostatisch wirkenden Pharmaka gibt es eine Gruppe von Substanzen, deren Einwirkung auf das Knochenmark sich ebenfalls in einer Erniedrigung des Mitoseindex der Granuloblasten ausdrückt. Da dieser Effekt auch von ionisierenden Strahlen hervorgerufen wird, werden Pharmaka mit gleicher Wirkung Radiomimetika genannt. Zu ihnen rechnet man z.B. einige Folsäureantagonisten und andere Stoffwechselgifte, wie die Senfgasderivate u.a. Das wirksame Prinzip dieser Stoffe wird in der Hemmung von Stoffwechselvorgängen am Ende der Interkinese oder in der Phase der Verdoppelung des Kernmaterials gesehen. Der Zellkern wird so geschädigt, dass - ohne wesentliche Strukturveränderungen - der Eintritt in die Mitose verzögert wird. (DUSTIN (13)). ALBRECHT und BOLL (2) fanden die Mitoserate der Granuloblasten in vitro unter der Einwirkung des Folsäureantagonisten Aminopterin stark erniedrigt; sie erklären diesen - dosisunabhängigen - Effekt durch eine Verlängerung der Interkinesedauer. In neuester Zeit haben

BOLL und FUCHS (11) eine mathematische Bestätigung der Vorstellung, dass der herabgesetzte Mitoseindex durch eine verlängerte Interkinese verursacht wird, bei der Untersuchung des Einflusses von Röntgenstrahlen auf die Granulopoese dargelegt. Die Verringerung der Mitoseindex-Werte durch Röntgenstrahlen ist - anders als unter Stilbamidineinwirkung - dosisabhängig, die Reifung der Granuloblasten wird - wie unter Stilbamidineinwirkung - nicht beeinträchtigt.

Nach den von BOLL (6) beschriebenen Ergebnissen aus Lebendbeobachtungen von Knochenmarkzellen ist bei verringerter Mitosedauer eine unterschiedliche Verkürzung der einzelnen Mitosephasen - besonders eine Herabsetzung der Metaphasenzeit - und damit eine Verschiebung in der caryologischen Kurve zu erwarten. Da sich nach Stilbamidinzusatz weder in der prozentualen Verteilung der einzelnen Mitosephasen noch im morphologischen Bild der Zell-, Kern- oder Mitoseformen wesentliche Aenderungen gegenüber den Verhältnissen in den Kontrollkulturen feststellen lassen, ist eine zeitliche Veränderung - d.h. hier eine Verkürzung - des Mitoseablaufs wenig wahrscheinlich.

In Bezug auf die Erniedrigung des Mitoseindex der Granuloblasten ähnelt Stilbamidin den Röntgenstrahlen und Radiomimetika, für die als Ursache des Effektes eine Verlängerung der Granuloblastengenerationszeit bekannt ist. Ausserdem zeigt sich in den hier vorliegenden Untersuchungen, dass Stilbamidin die Verteilung der Mitosephasen im weissen Zellsystem nicht beeinflusst.

Als Ursache der unter Stilbamidineinwirkung festgestellten Herabsetzung der Granuloblastenmitoseindices wird deshalb die Verlängerung der Interkinese - und damit die Verringerung der Teilungsaktivität der Granuloblasten - als wahrscheinlicher angesehen als die Verkürzung des Mitoseablaufs.

In diesem Sinne ist Stilbamidin als Proliferationsgift mit mässiger cytostatischer Wirkung auf die Granulopoese zu betrachten.

VI. Zusammenfassung

In fünf Versuchsreihen wird an Sternalpunktaten verschiedener Patienten die Beeinflussung der Erythro- und Granulopoese durch Stilbamidin in vitro untersucht. In jedem Fall wird ein Originalausstrich des Punktats angelegt, und es werden je drei Koagulumkulturen mit unterschiedlich konzentrierten Zusätzen von Stilbamidin und eine Kontrollkultur ohne Zusatz 24 und 48 Stunden lang bebrütet und nach Fixation und Färbung durch Differentialzählung ausgewertet.

Die Proliferationseigenschaften des roten und weissen Zellsystems werden besonders berücksichtigt. Die Reifungsverhältnisse der Granulo- und Erythropoese in vitro zeigen keine Aenderungen, die von den Stilbamidinzusätzen abhängig zu machen sind. Ein Stilbamidineinfluss lässt sich nur in der zeit- und dosisunabhängigen Herabsetzung der Mitoseindices der Granuloblasten auf 2/3 gegenüber den Kontrollkulturen feststellen. Die Ursache dieses Effektes und die cytostatische Wirksamkeit von Stilbamidin werden diskutiert.

Die Verringerung der Teilungsaktivität der Granuloblasten wird als wahrscheinliche Ursache der durch Stilbamidin erniedrigten Mitoseraten angesehen, ohne dass es möglich ist, eine verkürzte Mitosedauer als Ursache des beobachteten Effektes mit Sicherheit auszuschliessen.

VII. Literaturverzeichnis

1. ALBRECHT, M. und BOLL, I.: Untersuchungen über die Einwirkung von Colchicin, arseniger Säure und Aethylurethan auf menschliches Knochenmark in vitro; Aerztl.Wschr. 5, 27, 485 (1950)

2. ALBRECHT, M. und BOLL, I.: Die Einwirkung von Aminopterin auf menschliches Knochenmark in vitro; Z. Krebsforsch. 57, 496 (1951)

3. BICHEL, J., zit. n. GOLDECK, H.: Spezielle Therapie der Blutkrankheiten; Enke Verlag, Stuttgart (1955)

4. BICHOWSKI-SLOMNITZKY, L.: The effect of aromatic diamidines on bacterial growth; J. bact. 55, 27+33 (1948), J. Arch.biochem. 27, 294 (1951)

5. BODIAN, MARSHALL, WALLACE: zit. n. SQUIRE, J.P.; Proc.roy.soc.med. 55, 393 (1962)

6. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro; I. Granuloblastenmitosen; Folia haemat. 3, 1, 78, (1958)

7. BOLL, I.: Studien zur Proliferationsaktivität der menschlichen Knochenmarkzellen mittels Einzelautoradiographien nach Radiophosphorzusatz in vitro; Acta haemat. 18, 6, 390 (1957)

8. BOLL, I.: Persönliche Mitteilung unveröffentlichter Angaben (1951, 1962)

9. BOLL, I.: The maturation of normal Granulocytopoiesis in vitro compared with that of chronic Myelocytic Leukemia; IX. Europ. Haemat.Kongr., Lissabon (1963)

10. BOLL, I. und FUCHS, G.: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro; Blut VII, 157 (1961)

11. BOLL, I. und FUCHS, G.: Unterschiedliche Strahlenwirkung auf die Erythro- und Leukopoese in vitro; Proc. 8th Congr.Europ.soc.haemat., Wien 1961, S. 339

12. DAMESHEK, W. und GUNZ, F.W.: Leukemia; Grune & Stratton, New York, London (1960)

13. DUSTIN, P.: Die cytostatischen Substanzen und ihre Wirkung auf die Haemopoese; in: Handb. der ges. Haematologie, III, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien (1960)

14. FIESCHI, A. und SACCHETTI, C.: in Handb. der ges. Haematologie, I, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien (1957)

15. FLIEDNER, T.M. und CRONKITE, E.P.; X. internat.haem. congr., Stockholm (1964)

16. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958)

17. GOLDECK, H.: Spez. Therapie der Blutkrankheiten; Enke, Stuttgart (1955)

18. GOODMAN, L. and GILMAN, A.: The pharmacological basis of therapeutics; Macmillan Co., New York (1955)

19. GROSS, R. und BOCK, H.E.: Chemotherapie der Tumorleiden; Klinik der Gegenwart, 5, 235 (1957)

20. GUNZ, F.W.: zit.n. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958)

21. HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie; Thieme, Leipzig (1960)

22. HAWKING, F. : The absorption of Stilbamidin by Trypanosoma and its blood concentration in animals; J.pharmacol. and exp.ther., 82, 31 (1944)

23. HEILMEYER, L., MERK, R. und PIRWITZ, J.: Klinik und Pharmakologie des Urethans und anderer Cytostatica; Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1948)

24. HEILMEYER, L.: Lehrbuch der Inneren Medizin; Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1961)

25. HOCHSTER, R. and QUASTEL, J.: Metabolic inhibitors; vol. II, Academic press, New York (1963)

26. HORSTER, J.A. und SANDKUEHLER, S.: Klinische Erfahrungen mit Stilbamidin und Pentamidin; Z. klin.Med. 146, 550 (1950)

27. HORSTER, J.A. und ESSER, H.: Beitrag zur Pentamidinbehandlung; Arch. inn.Med. 1 (1949)

28. IVADY, G. und PALDY: Ein neues Behandlungsverfahren der interzellulären, plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit 5-wertigem Stibium und aromatischen Diamidinen; M.Schr.Kinderheilk., 106,10 (1958)

29. IVADY, G., PALDY, UNGER: Weitere Erfahrungen in der Behandlung von interzellulärer, plasmazelliger Pneumonie mit Pentamidin; M.Schr.Kinderheilk. 111, 197 (1963)

30. JANSCO VON, H. u.a.: Die Heilwirkung von Guanidinderivaten auf die Trypanosomeninfektion; Zeitschr. Immunforsch. und exp.Ther., 86, 1 (1935)

31. JOURNOUD, R.: zit.n. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958)

32. LOURIE, E.M. and YORKE: The trypanocidal action of certain aromatic diamidines; Ann.trop.med. 33, 289 (1939)

33. KARNOFSKY, D.: Inhibitory effect of drugs on normal and neoplastic blood cell formation; in : DRILL, V.A.: Pharmacology in medicine. McGraw-Hill Book Co., New York (1958)

34. KOHN: zit.n. HEILMEYER, L., MERK, R. und PIRWITZ, J.: Klinik und Pharmakologie des Urethans und anderer Cytostatica; Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1948)

35. KOPAC, M.J.: 1) Tr.New York acad.sc., 8,5 (1945), 2) Cancer Res., 7,44 (1947)

36. NEWTON, B.A.: in: HOCHSTER, R. and QUASTEL, J.: Metabolic inhibitors; vol. II, Academic press, New York (1963)

37. ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark; Thieme, Stuttgart (1960)

38. SALERA, U. und TAMBURINO, G.: zit.n.GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958)

39. SCHOEN, R. und TISCHENDORF, W.: Klinische Pathologie der Blutkrankheiten; Thieme, Stuttgart (1950)

40. SCHULTEN, H. und PRIBILLA, B.: Med.Klin. 1631 (1955)

41. SNAPPER, I. and SCHNEID, B.: Influence of Stilbamidin on myeloma cells; Blood 1, 5,534 (1946)

42. SNAPPER, I.: Stilbamidin and Pentamidin in Multiple Myeloma; J. amer.med.asso. 133,157 (1947)

43. SNAPPER, I.: Treatment of Multiple Myeloma with Stilbamidin, clinical results and morphological changes; J. amer.med.asso. 137,513 (1948)

44. SNAPPER, I., LIEBEN, F., GREENSPAN and SCHNEID, B.: Determination of Stilbamidin and 2-Hydroxy-Stilbamidin deposited in parenchymatous organs and tumors; Cancer, 4, 1246 (1951)

45. SNAPPER, I., SCHNEID, B., MCVAY, L. and LIEBEN, F.: Pharmacology and therapeutic value of diamidine-derivates, particularly of 2-Hydroxy-Stilbamidin; Tr.New York acad.sc. 14, 269 (1952)

46. WEICKER, H.: zit. n. 1) BOLL, I. und FUCHS, G.: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro; Blut VII, 157 (1961); 2) GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift (1958); 3) ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark; Thieme, Stuttgart, (1960)

47. WINTROBE, M.: Clinical hematology; Lea and Febiger, Philadelphia (1962)

48. Documenta Geigy, wissenschaftliche Tabellen; 6. Aufl., Basel (1960)

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Irene Boll
möchte ich für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit aufrichtig danken.

Lebenslauf;

am 23. Februar 1940 wurde ich, Ralf Bernd Sterzel, als Sohn des Kaufmanns Rolf Sterzel und seiner Ehefrau Brigitte, geborene Henninges, in Regenwalde, Pommern, geboren. Nach der Grundschule in Aumühle bei Hamburg besuchte ich ab 1951 das Realgymnasium in Reinbek, wo ich 1959 die Reifeprüfung bestand. Nach dem 18-monatigen Wehrdienst begann ich im November 1960 das Medizinstudium an der Universität Freiburg i. Br. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1963 an der Freien Universität Berlin. Nach 3 klinischen Semestern in Berlin studierte ich für 2 Semester in Zürich und für 1 Semester in Freiburg i. Br. Hier bestand ich am 2. September 1966 die ärztliche Prüfung.
Ab Oktober 1966 werde ich im Rahmen der Medizinalassistentenausbildung in einem städtischen Krankenhaus in Hamburg arbeiten.